

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 295 156 B1**

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

- (49) Date de publication de fascicule du brevet: **26.04.95** (51) Int. Cl.⁶ **C12N 15/32, C12N 1/21, C12P 21/02, A01N 63/00, A01H 5/00**
- (21) Numéro de dépôt: **88401121.4**
- (22) Date de dépôt: **06.05.88**

- (54) Séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

- (30) Priorité: **10.06.87 FR 8708090**
- (43) Date de publication de la demande: **14.12.88 Bulletin 88/50**
- (45) Mention de la délivrance du brevet: **26.04.95 Bulletin 95/17**
- (84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE
- (56) Documents cités:
EP-A- 0 178 151
EP-A- 0 192 319
EP-A- 0 224 331
EP-A- 0 228 838

- (73) Titulaire: **INSTITUT PASTEUR**
28, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cédex 15 (FR)

Titulaire: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
15, quai Anatole France
F-75007 Paris (FR)

Titulaire: **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**
145, rue de l'Université
F-75341 Paris Cédex 07 (FR)

- (72) Inventeur: **Sanchis, Vincent**
15 avenue Toulouse Lautrec
F-78390 Bois d'Arcy (FR)
Inventeur: **Lereclus, Didier**
16 bis rue Lauriston
F-75116 Paris (FR)
Inventeur: **Menou, Ghislaine**
22 rue Rosenwald
F-75015 Paris (FR)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

5 Elle vise plus spécialement des moyens, en particulier des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou encore des vecteurs, ou des souches bactériennes, modifiés par ces séquences et exprimant des polypeptides permettant de préparer des compositions larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de préférence vis-à-vis de *Spodoptera littoralis* (ci-après *S.littoralis*) ou *Mamestra brassicae* (ci-après désignée par *M.brassicae*) ou capables de transformer les plantes à traiter en leur conférant ce type d'activité.

10 On sait que la plupart des isolats de *B.thuringiensis* présentent une activité toxique à l'égard de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

Cette activité résulte, de la capacité des souches de *B.thuringiensis* à synthétiser, au moment de la sporulation, des inclusions cristallines de nature protéique, ou δ -endotoxines, sous le contrôle d'un ou plusieurs types de gènes.

15 On a montré que l'activité de ces polypeptides est contenue dans la moitié NH_2 -terminale ou N-terminale de la protéine.

Les travaux réalisés ont montré la spécificité élevée des δ -endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce donnée.

20 En raison de cette spécificité élevée, de nombreuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux préparations commerciales de *B.thuringiensis* disponibles.

Il en est ainsi en particulier de l'espèce *S.littoralis*, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraîchers comme le chou ou la tomate.

25 On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment *S.littoralis* ou *M.brassicae*.

Les gènes de δ -endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de *S.littoralis*.

30 Dans une publication dans "Molecular Biology of Microbial Differentiation" p.217-222, Sept. 1984, Klier et al. ont décrit l'expression dans *E.coli* d'un fragment *Bam*HI de 13 kb d'un gène d'une protéine du crystal de *B.thuringiensis aizawai* 7.29. Ce fragment d'ADN exprime un polypeptide d'environ 130 kDa.

La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de *S.littoralis*, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de *B.thuringiensis* dont l'activité larvicide sur *S.littoralis* apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à partir d'autres souches de *B.thuringiensis*.

35 Il s'agit des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01.

L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de δ -endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre *P.brassicae* mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de *P.brassicae* et de *S.littoralis*.

40 En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de δ -endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de préférence contre *S.littoralis*.

45 L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie NH_2 -terminale d'une δ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre *S.littoralis* ou *M.brassicae*.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

50 L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides l'égard des Noctuelles, en particulier de *S.littoralis* et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

55 L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis*, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de *S.littoralis*.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique *in vitro* de séquences de nucléotides de *B.thuringiensis* capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction

5 HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique *in vitro* de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de *B.thuringiensis*. Dans une variante de réalisation

10 de l'invention, deux souches différentes de *B.thuringiensis* sont mises en oeuvre.

Des souches de *B.thuringiensis* particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° 1-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

15 D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de *S.littoralis*.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

20

```

      52
GTC TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT CGG GCA TAT ATT GAT
      112
ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
25 TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT ACT TTA ATA AAA AAA CCG
      232

AGG TAT TTT ATG CAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA ACT AAT
      292

CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
30      352
TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT
      412

GGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA
35      472

CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT
      532

AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TGG CAA
      592
40 GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGG TTT CGT ATA CTT GAT
      652

GGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
      712
45 TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      772

GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACG
      832

CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT CCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
50      892

CCG AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CGG ACA GAC TTA ACA TTG
      952

ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

```

55

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

de préférence vis-à-vis de S.littoralis sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs Btl, BtII et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

20

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN

PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE

25

SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL

GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL

30

GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA

ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU

35

GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP

GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU

40

SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE

GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG

HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU

45

PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU

THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

50

Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

1091
 1090
 1089
 1088
 1087
 1086
 1085
 1084
 1083
 1082
 1081
 1080
 1079
 1078
 1077
 1076
 1075
 1074
 1073
 1072
 1071
 1070
 1069
 1068
 1067
 1066
 1065
 1064
 1063
 1062
 1061
 1060
 1059
 1058
 1057
 1056
 1055
 1054
 1053
 1052
 1051
 1050
 1049
 1048
 1047
 1046
 1045
 1044
 1043
 1042
 1041
 1040
 1039
 1038
 1037
 1036
 1035
 1034
 1033
 1032
 1031
 1030
 1029
 1028
 1027
 1026
 1025
 1024
 1023
 1022
 1021
 1020
 1019
 1018
 1017
 1016
 1015
 1014
 1013
 1012
 1011
 1010
 1009
 1008
 1007
 1006
 1005
 1004
 1003
 1002
 1001
 1000
 999
 998
 997
 996
 995
 994
 993
 992
 991
 990
 989
 988
 987
 986
 985
 984
 983
 982
 981
 980
 979
 978
 977
 976
 975
 974
 973
 972
 971
 970
 969
 968
 967
 966
 965
 964
 963
 962
 961
 960
 959
 958
 957
 956
 955
 954
 953
 952
 951
 950
 949
 948
 947
 946
 945
 944
 943
 942
 941
 940
 939
 938
 937
 936
 935
 934
 933
 932
 931
 930
 929
 928
 927
 926
 925
 924
 923
 922
 921
 920
 919
 918
 917
 916
 915
 914
 913
 912
 911
 910
 909
 908
 907
 906
 905
 904
 903
 902
 901
 900
 899
 898
 897
 896
 895
 894
 893
 892
 891
 890
 889
 888
 887
 886
 885
 884
 883
 882
 881
 880
 879
 878
 877
 876
 875
 874
 873
 872
 871
 870
 869
 868
 867
 866
 865
 864
 863
 862
 861
 860
 859
 858
 857
 856
 855
 854
 853
 852
 851
 850
 849
 848
 847
 846
 845
 844
 843
 842
 841
 840
 839
 838
 837
 836
 835
 834
 833
 832
 831
 830
 829
 828
 827
 826
 825
 824
 823
 822
 821
 820
 819
 818
 817
 816
 815
 814
 813
 812
 811
 810
 809
 808
 807
 806
 805
 804
 803
 802
 801
 800
 799
 798
 797
 796
 795
 794
 793
 792
 791
 790
 789
 788
 787
 786
 785
 784
 783
 782
 781
 780
 779
 778
 777
 776
 775
 774
 773
 772
 771
 770
 769
 768
 767
 766
 765
 764
 763
 762
 761
 760
 759
 758
 757
 756
 755
 754
 753
 752
 751
 750
 749
 748
 747
 746
 745
 744
 743
 742
 741
 740
 739
 738
 737
 736
 735
 734
 733
 732
 731
 730
 729
 728
 727
 726
 725
 724
 723
 722
 721
 720
 719
 718
 717
 716
 715
 714
 713
 712
 711
 710
 709
 708
 707
 706
 705
 704
 703
 702
 701
 700
 699
 698
 697
 696
 695
 694
 693
 692
 691
 690
 689
 688
 687
 686
 685
 684
 683
 682
 681
 680
 679
 678
 677
 676
 675
 674
 673
 672
 671
 670
 669
 668
 667
 666
 665
 664
 663
 662
 661
 660
 659
 658
 657
 656
 655
 654
 653
 652
 651
 650
 649
 648
 647
 646
 645
 644
 643
 642
 641
 640
 639
 638
 637
 636
 635
 634
 633
 632
 631
 630
 629
 628
 627
 626
 625
 624
 623
 622
 621
 620
 619
 618
 617
 616
 615
 614
 613
 612
 611
 610
 609
 608
 607
 606
 605
 604
 603
 602
 601
 600
 599
 598
 597
 596
 595
 594
 593
 592

[illegible]

De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique
55 de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis* comprennent ou sont constituées par l'enchaînement (III) défini précédemment.

L'enchaînement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la δ -endotoxine active sur *S.littoralis*.

Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de *S.littoralis*.

5 Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

10 De même toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de lecture de 2470 nucléotides.

15 L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

20

25

30

35

40

45

50

55

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE
 271 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER
 281 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER
 451 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU
 541 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE
 631 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR
 721 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
 811 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER
 901 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 1081 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 1171 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

114
 1301
 2071
 2101
 2201
 2341
 2431
 2521
 2611
 2701

PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR THR ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 LEU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 CYS SER CYS

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les ensembles ci-après, qui comprend un fragment

d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb issu de la souche aizawai 7-29.

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

L'invention vise plus particulièrement la partie NH₂-terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie NH₂-terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes. Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de δ -endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des δ -endotoxines provenant d'autres souches de B.thuringiensis actives sur les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des δ -endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie NH₂ terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine COOH terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la δ -endotoxine correspondant à la séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres δ -endotoxines, aussi bien dans la partie NH₂ terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore que la moitié NH₂-terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres δ -endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH₂-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres δ -endotoxines. De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH₂-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les δ -endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, aux étapes suivantes, à savoir :

- la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de δ -endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH₂-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,
- l'isolement du fragment hybridé,
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de δ -endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7-29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotides issues de souches

B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ, élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1.1kb provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1.9kb de la souche aizawai 7-29. Il correspond à un gène tronqué de δ -endotoxine.

Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHT6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de lépidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité toxique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport

CL50 S.littoralis

CL50 P.brassicae

dans lequel "CL50" représente la concentration létale tuant 50% des larves en 72 heures.

L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité toxique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

Les compositions larvicides de l'invention sont alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

pour produire ces polypeptides on met avantageusement en oeuvre les gènes tronqués de δ -endotoxine correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur des gènes de δ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les bactéries gram

négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de δ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres δ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées *in vitro* ou *in vivo* avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de δ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles protéines toxiques hybrides présentant un large spectre activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides pHTA6 et pHTE6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6.6kb cloné dans pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,
- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et
- la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN marquée au ³²P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0.5 x SSC avant séchage à température ambiante.

EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

- 1/ la préparation de banques de gènes de B.thuringiensis
- 2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,
- 3/ recombinaison *in vitro* de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

1 Préparation de banques de gènes de *B. thuringiensis*.

L'ADN total des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01 de *Bacillus thuringiensis* est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50 µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction *Pst*I.

L'ADN digéré par *Pst*I est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0.8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche *aizawai* 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par *Pst*I selon (3).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche *entomocidus* 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par *Pst*I. Les cellules de *E.coli* JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

Les clones transformants de *E.coli* sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2: Isolation et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de *E.coli* transformées à l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au ³²P, utilisé comme sonde :

Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), utilisant comme sonde un fragment *Pvu*II de 2 kb du plasmide pBT 15-88 (EMBO J., 1 : 791-799) correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche *berliner* 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à partir des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la δ -endotoxine, différents fragments d'ADN marqués au ³²P, provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche *aizawai* 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre *P.brassicae* mais pas contre *S.littoralis*. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la δ -endotoxine issu de la souche *berliner* 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce gène de la protéine du cristal de la souche de *aizawai* 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitrocellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42 °C pendant 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au ³²P. Les filtres sont ensuite lavés à 42 °C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente une homologie avec les sondes. Le fragment *Pst*I-KpnI de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment *Hind*III-HincII de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n° 3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment *Hind*III-*Pst*I de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont établi que le fragment d'ADN *Hind*III-*Pst*I de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la δ -endotoxine qui commence près du site *Hind*III central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la δ -endotoxine

présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

3. Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHT66 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de E.coli JM83, puis les cellules transformées de E.coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHT66, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie NH₂ terminale de la δ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé conformément la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchaînement ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 241 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologe à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs Btl, BtII, et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est la première fois qu'un gène de la δ -endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparaît fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type lépidoptères.

EXEMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche aizawai 7.29 de B.thuringiensis jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

Le fragment HindIII-PstI de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al(9). Ce système permet d'obtenir des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.

La séquence de nucléotides de ce fragment de 2.7kb qui correspond à l'enchaînement (III) donné ci-dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la δ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM β 1) contre les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est exprimée en termes d' "indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en μ g de protéine cristal par μ l de préparation. L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5 μ l de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

TABLEAU 1

Toxicité comparée d'un clone recombinant et de deux souches de <u>B.thuringiensis</u> vis-à-vis de <u>S.littoralis</u> et <u>P.brassicae</u> .				
Souches et plasmides	<u>S.littoralis</u>		<u>P.brassicae</u>	Indice de spécificité CL50 <u>S.littoralis</u> CL50 <u>P.brassicae</u>
	CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	
JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1	-
JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72	0,2
JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03	> 30
JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1	-
JM83 (pHT71)	ND	0,5	> 1	< 0,5
<u>berliner 1715</u> cristaux natifs	ND	0,11	0,007	15,7
<u>aizawai 7.29</u> cristaux natifs	ND	0,02	0,04	0,5
<u>entomocidus 601</u> cristaux natifs	ND	0,028	0,012	2,3
<u>B.cereus 569</u> (pBT45,pAM β 1)	ND	0,38	0,054	7

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S.littoralis. En second lieu une comparaison des valeurs de 1 indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S.littoralis que les protéines du cristal

natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0.02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

5 Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S.littoralis.

D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de δ -endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S.littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une δ -endotoxine spécifiquement active sur P.brassicae 10 alors que le plasmide pHTA4 code pour une δ -endotoxine dont l'insecte cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7-29 qui porte aussi un gène de δ -endotoxine (le gène d'origine plasmidique de la souche aizawai 7-29), sont également spécifiquement actives sur P.brassicae.

15 Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des extraits protéiques solubles préparés à partir de différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2.4 μ g/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

20 Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5.5 à 6 μ g/gramme de larve.

25 Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4.15 μ g/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. 30 Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une δ -endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de δ -endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350 μ g/gramme de larve).

35 Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M.brassicae, S.frugiperda et S.littoralis. Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

40

45

50

55

TABLEAU 2
 ACTIVITE DES CLONES RECOMBINANTS
 CONTRE LES LARVES D'INSECTES
 DE LA FAMILIE DES NOCTUIDAE
M. BRASSICAE, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

SOUCHES ET PLASMIDES	LARVE D'INSECTE ET STADE	<u>M. BRASSICAE</u>		<u>S. FRUGIPERDA</u>		<u>S. LITTORALIS</u>	
		CL50 2ème STADE		CL50 2ème STADE		CL50 2ème STADE	
JM 83 (pUC18)		NT		NT		NT	
JM 83 (pHTA2)		> 1		0,51		0,9	
JM 83 (pHT671)		0,02		0,5		0,03	
JM 83 (pHT71)		ND		ND		0,03	
JM 83 (pHTA4)		> 1		0,54		> 1	

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 0.02 et 0.03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S.frugiperda (CL50 de 0.5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S.frugiperda et de S.littoralis et pas du tout toxique à l'égard de M.brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83

(pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M.brassicæ et de S.littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S.frugiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pHT671 à l'égard de S.littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M.brassicæ.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

La mise en oeuvre de l'expérience d'immunodiffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7-29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un antisérum contre toutes les δ -endotoxines de aizawai 7-29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

Une ligne d'immunoprécipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

On a remarqué que les lignes d'immunoprécipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants anti-géniques différents.

Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'anti-sérum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

Une ligne d'immunoprécipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprécipitation.

On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de δ -endotoxine dans différents clones recombinants.

Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli JM83 (pHT71).

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

- (1) Klier, A.F., LECADET, M.-M. and DEDONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., **36** : 317-327.
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- (3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, **19** : 259-268.
- (4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella thyphimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., **119** : 1072-1074.
- (5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72** : 3961-3965.
- (6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., **98**, 503-517.
- (7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., **23** : 641-646.

- (8)SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.
- (9)DALE et al.(1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA. Plasmid 1985, 13 : 31-40
- 5 (10)LECADET.M.M. et MARTOURET D.1987. Host specificity of the Bacillus thuringiensis δ -endotoxin toward Lepidopteran species : Spodoptera littoralis Bdv and Pieris brassicae L. J. of Invert. Pathol., 49 - (n° 1) : 37-48.
- (11)CHANG et al., 1979. High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA- Mol Gen Genet 168:111 115
- 10 (12)HEIERSON et al., 1987. Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar.1987. p.1147-1152.
- (13)KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes, Mol Gen Genet (1983) 191:257 262
- (14)LERECLUS et al., 1983. Isolation of a DNA. sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis plasmid pAM β 1, Mol Gen Genet (1983) 191:307-313
- 15 (15)UMBECK et al., 1987. Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.
- (16)WONG et al., 1983. transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.
- 20 (17)OBUKOWICZ M.et al (1986). Tn⁵ mediated integration of the δ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol., 168, 982-989.
- (18)SIMON, R. et al. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1, pp. 784-791.
- 25 (19)Schnepf et al.(1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.
- (20)Adang et al. (1985) characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.
- (21)Wabiko et al.(1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA 5 : 305-314.
- 30 (22)Hofte et al.(1986) Structural and functional analysis of a cloned δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.
- (23)Shibano et al.(1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J.Ganesan, A.T., Hoch, J.A.(eds). Academic Press 307-320.
- 35 (24)Oeda et al.(1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

Revendications

- 40 1. Séquence d'ADN codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'ADN d'environ 3 kb correspondant au fragment de restriction HindIII - PstI provenant de B.thuringiensis souche aizawai 7.29.
- 45 2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fragment de restriction HindIII - PstI est capable d'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.
- 50 3. Séquence d'ADN selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.
4. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.
- 55 5. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle code pour polypeptide toxique de S.littoralis.

6. Séquence d'ADN codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment d'ADN correspondant au fragment de restriction HindIII - HincII d'environ 1.1 kb provenant de B.thuringiensis souche entomocidus 6-01 fusionné avec un fragment de restriction HincII - PstI d'environ 1.9 kb provenant de B.thuringiensis souche aizawai 729.
7. Séquence d'ADN selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.
8. Séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant:

```

15      52
      GTC TAC TTC ACA CGC GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GCG GCA TAT ATT GAT
      112
      ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTC TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
      TCG TGG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CGC
20      232
      AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT
      292
      CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
      352
25      TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GCA GCA TTT TTA GTT
      412
      GGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GGA ATA GTT CGC CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA
      472
30      CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT
      532
      AAT TTA GAA GCA TTA GCA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG CAA
      592
35      GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGC ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT CGT ATA CTT GAT
      652
      CGC CTA CTT GAA AGC GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CGC CTT TTA
      712
40      TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      772
      GGA GAA AGA TCG GCA TTC ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACC
      832
45      CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT GAC TGT CCA AAT ACG TAT AAT CGG GCA TTA AAT AAT TTA
      892
      CCG AAA TCT ACG TAT CAA GAT TCG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CGG AGA GAC TTA ACA TTC
      952
      ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC
50

```

ou à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

55

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

991
 1081
 1171
 1261
 1351
 1441
 1531
 1621
 1711
 1801
 1891
 1981
 2071
 2161
 2251
 2341
 2431
 2521
 2611
 2701
 2791
 2881
 2971
 3061
 3151
 3241
 3331
 3421
 3511
 3601
 3691
 3781
 3871
 3961
 4051
 4141
 4231
 4321
 4411
 4501
 4591
 4681
 4771
 4861
 4951
 5041
 5131
 5221
 5311
 5401
 5491
 5581
 5671
 5761
 5851
 5941
 6031
 6121
 6211
 6301
 6391
 6481
 6571
 6661
 6751
 6841
 6931
 7021
 7111
 7201
 7291
 7381
 7471
 7561
 7651
 7741
 7831
 7921
 8011
 8101
 8191
 8281
 8371
 8461
 8551
 8641
 8731
 8821
 8911
 9001
 9091
 9181
 9271
 9361
 9451
 9541
 9631
 9721
 9811
 9901
 9991
 10081
 10171
 10261
 10351
 10441
 10531
 10621
 10711
 10801
 10891
 10981
 11071
 11161
 11251
 11341
 11431
 11521
 11611
 11701
 11791
 11881
 11971
 12061
 12151
 12241
 12331
 12421
 12511
 12601
 12691
 12781
 12871
 12961
 13051
 13141
 13231
 13321
 13411
 13501
 13591
 13681
 13771
 13861
 13951
 14041
 14131
 14221
 14311
 14401
 14491
 14581
 14671
 14761
 14851
 14941
 15031
 15121
 15211
 15301
 15391
 15481
 15571
 15661
 15751
 15841
 15931
 16021
 16111
 16201
 16291
 16381
 16471
 16561
 16651
 16741
 16831
 16921
 17011
 17101
 17191
 17281
 17371
 17461
 17551
 17641
 17731
 17821
 17911
 18001
 18091
 18181
 18271
 18361
 18451
 18541
 18631
 18721
 18811
 18901
 18991
 19081
 19171
 19261
 19351
 19441
 19531
 19621
 19711
 19801
 19891
 19981
 20071
 20161
 20251
 20341
 20431
 20521
 20611
 20701
 20791
 20881
 20971
 21061
 21151
 21241
 21331
 21421
 21511
 21601
 21691
 21781
 21871
 21961
 22051
 22141
 22231
 22321
 22411
 22501
 22591
 22681
 22771
 22861
 22951
 23041
 23131
 23221
 23311
 23401
 23491
 23581
 23671
 23761
 23851
 23941
 24031
 24121
 24211
 24301
 24391
 24481
 24571
 24661
 24751
 24841
 24931
 25021
 25111
 25201
 25291
 25381
 25471
 25561
 25651
 25741
 25831
 25921
 26011
 26101
 26191
 26281
 26371
 26461
 26551
 26641
 26731
 26821
 26911
 27001
 27091
 27181
 27271
 27361
 27451
 27541
 27631
 27721
 27811
 27901
 28001
 28091
 28181
 28271
 28361
 28451
 28541
 28631
 28721
 28811
 28901
 29001
 29091
 29181
 29271
 29361
 29451
 29541
 29631
 29721
 29811
 29901
 30001
 30091
 30181
 30271
 30361
 30451
 30541
 30631
 30721
 30811
 30901
 31001
 31091
 31181
 31271
 31361
 31451
 31541
 31631
 31721
 31811
 31901
 32001
 32091
 32181
 32271
 32361
 32451
 32541
 32631
 32721
 32811
 32901
 33001
 33091
 33181
 33271
 33361
 33451
 33541
 33631
 33721
 33811
 33901
 34001
 34091
 34181
 34271
 34361
 34451
 34541
 34631
 34721
 34811
 34901
 35001
 35091
 35181
 35271
 35361
 35451
 35541
 35631
 35721
 35811
 35901
 36001
 36091
 36181
 36271
 36361
 36451
 36541
 36631
 36721
 36811
 36901
 37001
 37091
 37181
 37271
 37361
 37451
 37541
 37631
 37721
 37811
 37901
 38001
 38091
 38181
 38271
 38361
 38451
 38541
 38631
 38721
 38811
 38901
 39001
 39091
 39181
 39271
 39361
 39451
 39541
 39631
 39721
 39811
 39901
 40001
 40091
 40181
 40271
 40361
 40451
 40541
 40631
 40721
 40811
 40901
 41001
 41091
 41181
 41271
 41361
 41451
 41541
 41631
 41721
 41811
 41901
 42001
 42091
 42181
 42271
 42361
 42451
 42541
 42631
 42721
 42811
 42901
 43001
 43091
 43181
 43271
 43361
 43451
 43541
 43631
 43721
 43811
 43901
 44001
 44091
 44181
 44271
 44361
 44451
 44541
 44631
 44721
 44811
 44901
 45001
 45091
 45181
 45271
 45361
 45451
 45541
 45631
 45721
 45811
 45901
 46001
 46091
 46181
 46271
 46361
 46451
 46541
 46631
 46721
 46811
 46901
 47001
 47091
 47181
 47271
 47361
 47451
 47541
 47631
 47721
 47811
 47901
 48001
 48091
 48181
 48271
 48361
 48451
 48541
 48631
 48721
 48811
 48901
 49001
 49091
 49181
 49271
 49361
 49451
 49541
 49631
 49721
 49811
 49901
 50001
 50091
 50181
 50271
 50361
 50451
 50541
 50631
 50721
 50811
 50901
 51001
 51091
 51181
 51271
 51361
 51451
 51541
 51631
 51721
 51811
 51901
 52001
 52091
 52181
 52271
 52361
 52451
 52541
 52631
 52721
 52811
 52901
 53001
 53091
 53181
 53271
 53361
 53451
 53541
 53631
 53721
 53811
 53901
 54001
 54091
 54181
 54271
 54361
 54451
 54541
 54631
 54721
 54811
 54901
 55001
 55091
 55181
 55271
 55361
 55451
 55541
 55631
 55721
 55811
 55901
 56001
 56091
 56181
 56271
 56361
 56451
 56541
 56631
 56721
 56811
 56901
 57001
 57091
 57181
 57271
 57361
 57451
 57541
 57631
 57721
 57811
 57901
 58001
 58091
 58181
 58271
 58361
 58451
 58541
 58631
 58721
 58811
 58901
 59001
 59091
 59181
 59271
 59361
 59451
 59541
 59631
 59721
 59811
 59901
 60001
 60091
 60181
 60271
 60361
 60451
 60541
 60631
 60721
 60811
 60901
 61001
 61091
 61181
 61271
 61361
 61451
 61541
 61631
 61721
 61811
 61901
 62001
 62091
 62181
 62271
 62361
 62451
 62541
 62631
 62721
 62811
 62901
 63001
 63091
 63181
 63271
 63361
 63451
 63541
 63631
 63721
 63811
 63901
 64001
 64091
 64181
 64271
 64361
 64451
 64541
 64631
 64721
 64811
 64901
 65001
 65091
 65181
 65271
 65361
 65451
 65541
 65631
 65721
 65811
 65901
 66001
 66091
 66181
 66271
 66361
 66451
 66541
 66631
 66721
 66811
 66901
 67001
 67091
 67181
 67271
 67361
 67451
 67541
 67631
 67721
 67811
 67901
 68001
 68091
 68181
 68271
 68361
 68451
 68541
 68631
 68721
 68811
 68901
 69001
 69091
 69181
 69271
 69361
 69451
 69541
 69631
 69721
 69811
 69901
 70001
 70091
 70181
 70271
 70361
 70451
 70541
 70631
 70721
 70811
 70901
 71001
 71091
 71181
 71271
 71361
 71451
 71541
 71631
 71721
 71811
 71901
 72001
 72091
 72181
 72271
 72361
 72451
 72541
 72631
 72721
 72811
 72901
 73001
 73091
 73181
 73271
 73361
 73451
 73541
 73631
 73721
 73811
 73901
 74001
 74091
 74181
 74271
 74361
 74451
 74541
 74631
 74721
 74811
 74901
 75001
 75091
 75181
 75271
 75361
 75451
 75541
 75631
 75721
 75811
 75901
 76001
 76091
 76181
 76271
 76361
 76451
 76541
 76631
 76721
 76811
 76901
 77001
 77091
 77181
 77271
 77361
 77451
 77541
 77631
 77721
 77811
 77901
 78001
 78091
 78181
 78271
 78361
 78451
 78541
 78631
 78721
 78811
 78901
 79001
 79091
 79181
 79271
 79361
 79451
 79541
 79631
 79721
 79811
 79901
 80001
 80091
 80181
 80271
 80361
 80451
 80541
 80631
 80721
 80811
 80901
 81001
 81091
 81181
 81271
 81361
 81451
 81541
 81631
 81721
 81811
 81901
 82001
 82091
 82181
 82271
 82361
 82451
 82541
 82631
 82721
 82811
 82901
 83001
 83091
 83181
 83271
 83361
 83451
 83541
 83631
 83721
 83811
 83901
 84001
 84091
 84181
 84271
 84361
 84451
 84541
 84631
 84721
 84811
 84901
 85001
 85091
 85181
 85271
 85361
 85451
 85541
 85631
 85721
 85811
 85901
 86001
 86091
 86181
 86271
 86361
 86451
 86541
 86631
 86721
 86811
 86901
 87001
 87091
 87181
 87271
 87361
 87451
 87541
 87631
 87721
 87811
 87901
 88001
 88091
 88181
 88271
 88361
 88451
 88541
 88631
 88721
 88811
 88901
 89001
 89091
 89181
 89271
 89361
 89451
 89541
 89631
 89721
 89811
 89901
 90001
 90091
 90181
 90271
 90361
 90451
 90541
 90631
 90721
 90811
 90901
 91001
 91091
 91181
 91271
 91361
 91451
 91541
 91631
 91721
 91811
 91901
 92001
 92091
 92181
 92271
 92361
 92451
 92541
 92631
 92721
 92811
 92901
 93001
 93091
 93181
 93271
 93361
 93451
 93541
 93631
 93721
 93811
 93901
 94001
 94091
 94181
 94271
 94361
 94451
 94541
 94631
 94721
 94811
 94901
 95001
 95091
 95181
 95271
 95361
 95451
 95541
 95631
 95721
 95811
 95901
 96001
 96091
 96181
 96271
 96361
 96451
 96541
 96631
 96721
 96811
 96901
 97001
 97091
 97181
 97271
 97361
 97451
 97541
 97631
 97721
 97811
 97901
 98001
 98091
 98181
 98271
 98361
 98451
 98541
 98631
 98721
 98811
 98901
 99001
 99091
 99181
 99271
 99361
 99451
 99541
 99631
 99721
 99811
 99901
 100001
 100091
 100181
 100271
 100361
 100451
 100541
 100631
 100721
 100811
 100901
 101001
 101091
 101181
 101271
 101361
 101451
 101541
 101631
 101721
 101811
 101901
 102001
 102091
 102181
 102271
 102361
 102451
 102541
 102631
 102721
 102811
 102901
 103001
 103091
 103181
 103271
 103361
 103451
 103541
 103631
 103721
 103811
 103901
 104001
 104091
 104181
 104271
 104361
 104451
 104541
 104631
 104721
 104811
 104901
 105001
 105091
 105181
 105271
 105361
 105451
 105541
 105631
 105721
 105811
 105901
 106001
 106091
 106181
 106271
 106361
 106451
 106541
 106631
 106721
 106811
 106901
 107001
 107091
 107181
 107271
 107361
 107451
 107541
 107631
 107721
 107811
 107901
 108001
 108091
 108181
 108271
 108361
 108451
 108541
 108631

[illegible]

- 55 9. Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 8.

10. Séquence de nucléotides selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.
11. Séquence selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.
12. Séquence selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs Btl, BtII et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E. coli respectivement.
13. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après:

15

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASP

20

PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE

25

SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL

GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL

30

GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA

ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU

35

GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP

GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU

40

SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE

GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG

45

HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU

PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU

THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

50

ou caractérisée en

ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

55

60

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE
 281 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER
 291 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER
 301 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU
 311 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE
 321 ARG ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR
 331 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
 341 TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER
 351 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 1081
 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 1171
 THR ASP TAP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TAP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 1281
 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1331
 LEU LEU GLN GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
 1441
 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1531
 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TAP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 1621
 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711
 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 1801
 GLU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

11M MET PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR IAN ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 1901 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2161 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2251 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 GLN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TAP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TAP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TAP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

- 55 14. Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15. Plasmide selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII - PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29 cloné dans un vecteur pUC9 préalablement hydrolysé avec les enzymes HindIII et PstI.
- 5 16. Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 13.
17. Souche bactérienne selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinaut selon la revendication 14 ou 15.
- 10 18. Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis répondant à la séquence (II) ou à la séquence (IV) d'acides aminés.
- 15 19. Polypeptide selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 13.
- 20 20. Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1 codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :
 - la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'une part et de la partie 3' d'autre part, d'un fragment de restriction d'un gène d'une δ -endotoxine de B.thuringiensis souche aizawai 7-29, ces parties 5' et 3' codant respectivement pour la partie N-terminale et pour la partie COOH-terminale d'un polypeptide de 130 kd toxique vis-à-vis des lépidoptères et en particulier actif contre P.brassicae et inactif contre S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinaut pHTA2 tel que représenté sur la figure 2
 - l'isolement du fragment,
 - son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.
- 25 21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinaut contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.
- 30 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.
- 35 23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII - PstI provenant de la souche aizawai 7-29.
- 40 24. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII - HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII - PstI provenant de la souche aizawai 7-29.
- 45 25. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombinaut selon la revendication 23 est porté par un plasmide pHTA6 tel que représenté sur la figure 1 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 24, HindIII - HincII et HincII - PstI sont portés par les

5 plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 tel que représenté sur la figure 1 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

26. Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 18 et 19 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 13, le vecteur selon la revendication 14, ou le plasmide selon la revendication 15, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17.

27. Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour produire un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

28. Application selon la revendication 27, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

29. Application selon la revendication 27 ou 28, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de δ -endotoxine.

30. Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression de ces séquences dans ces plantes.

31. Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13 et, cellules issues de leur division.

32. Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et, plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

33. Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique répondant à la séquence d'acides aminés définie à la revendication 13, de manière préférentielle vis-à-vis S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

34. Graine capable de donner une plante selon la revendication 32 ou 33 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

50 Claims

1. DNA sequence encoding at least a portion of the N-terminal region of a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, characterized in that it contains a DNA fragment of about 3 kb corresponding to the HindIII - PstI restriction fragment derived from B. thuringiensis strain aizawai 7-29.

2. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that the HindIII - PstI restriction fragment is capable of hybridizing with probes 1, 2, 3 of pHTA2 presented in Figure 2.

3. DNA sequence according to Claim 1 or 2, characterized in that it comprises sites in the following order:
HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.
4. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that it encodes a polypeptide capable of forming
5 an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis.
5. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that it encodes a toxic polypeptide of S. littoralis.
6. DNA sequence encoding a polypeptide which is toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae
10 family, characterized in that it comprises a DNA fragment corresponding to the HindIII - HincII
restriction fragment of about 1.1 kb derived from B. thuringiensis strain entomocidus 6-01 fused with a
HincII - PstI restriction fragment of about 1.9 kb derived from B. thuringiensis strain aizawai 729.
7. DNA sequence according to Claim 6, characterized in that it encodes a polypeptide capable of forming
15 an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis.
8. Nucleotide sequence characterized in that it is capable of hybridizing with a probe formed from the
sequence (I) exhibiting the following configuration:

20

```

      52
    CTC TAC TTG ACA GCG GTA CGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT CCG GCA TAT ATT CAT
      112
    ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
    TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT ACT TTA ATA AAA AAA CCG
    25      232

    ACG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA ACT AAT
      292

    CCT CAA GAA GTA CTT TTG CAT GGA GAA GCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT CAT ATT
    30      352

    TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GCA GGA TTT TTA GTT
      412

    CGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GGA ATA GTT GCG CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA
      472
    35      532

    CAA ATT CAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT CAA TTT GCT ACG AAT GCT GCT ATT GCT
      592

    AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG CAA
      652
    40      712

    GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC ACG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT GGT ATA CTT CAT
      772

    CGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
      832
    45      892

    TCC GTT TAT GCT CAA CCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      952

    CGA GAA AGA TCG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACG
      952

    CAT ATT GAT GAA TAT GCT CAT CAC TGT CCA AAT ACG TAT AAT CCG CCA TTA AAT AAT TTA
    50      952

    CCG AAA TCT ACG TAT CAA CAT TCG ATA ACA TAT AAT CCA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTC
      952

    ACT GTA TTA CAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC
  
```

55

or from the sequence (III) exhibiting the following configuration:

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

951
 1081
 1171
 1261
 1351
 1441
 1531
 1621
 1711
 1801

1544
 GAT AAG CCA CTT CAG AAA AAC ATG GAG AAG AAG GAG TAC AAC TTA ACA TCT AAA ACA TTT AAA TAA TAA AAC TAA TTT AAC TAA TTT
 1581
 ACA CCA AAT CCA GAT ATA ATT GCG AAG AAT GAA CAA CCA CTA TTT GAT CTA GAT TCT ATT AGT AAC GCA CTT TAA AAG GAT AAA ATT
 2071
 GAG ATT AAT CTA GCA GAT GCA ACA TTT GAA GCA GAA TCT GAT TTA GAA AAG ACA CAA AAG GCG GAG GAG TTT ACT TCT TCC AAA
 2161
 CAA ATC GAG TTA AAA ACC GAT GTG ACC GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA GAT GAA TTT TGT CAG GAT
 2231
 GAA AAG LAA GAA TTA TCC GAG AAA GTC AAA CAT GCG AAA CCA CTC AAT GAT GAG GAG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC TTC AAG GAG ATC
 2341
 AAT ACA CAA CCA GAC CCA GAT GAT GAT ACA GAT ATT ACC ATC CAA GAA GAA GAT GAG GTA TTC AAA GAG AAT TAC GTC ACA CTA
 2431
 CCG GAT ACC GAT GAT CCA ACC TAT TTA TAA CAG AAA AAG GAT GAT GAG TCA AAA TTA AAA GAT TAA ACC CCA TAT GAA TTA AAG
 2521
 GAG TAT ATC GAA GAT AAT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATC GCG TAC AAT GCA AAA CAC GAA ATA GAT GAG CCA GAG AAC GAT TCC
 2611
 TTA TAA CCG CTT TCA GCG CAA AAT CCA ATC GCA AAG TGT GAA GAA CCG AAT CCA TCC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCA GAT CTA GAT
 2701
 TCT TCC TCC AG

- 55 9. Nucleotide sequence encoding a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, preferentially against S. littoralis, characterized in that it comprises the configuration (I) or (III) defined in Claim 8.

10. Nucleotide sequence according to Claim 8 or 9, characterized in that it has an ATG initiation codon situated at position 241.

5 11. Sequence according to any one of Claims 8 to 10, characterized by a ribosome binding site GGAGG at positions 230 to 234.

12. Sequence according to one of Claims 9 to 11, characterized in that it comprises the sequence between the nucleotides at position 137 and 177 (position -103 to -63 upstream of the ATG initiation codon) which is homologous in an amount of about at least 70 % to the region present upstream of the crystal gene of the kurstaki HD1 Dipel (BTK) strain which contains the three promoters Btl, BtII and Ec which are functional in B. thuringiensis and E. coli respectively.

13. Nucleotide sequence characterized in that it encodes a polypeptide comprising the following amino acid sequence (II):

15

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN
 PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE
 20 SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL
 GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL
 25 GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA
 ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU
 30 GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP
 GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU
 35 SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE
 GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG
 40 HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU
 PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU
 THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

45

or characterized in that it encodes a polypeptide comprising the following sequence (IV) of amino acids:

50

55

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

271
 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PEP GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER
 281
 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL IAP GLY ILE VAL GLY PRO SER
 291
 GLN IAP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU
 301
 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU IAP GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE
 311
 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR
 321
 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG IAP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
 331
 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER
 341
 THR TYR GLN ASP IAP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ASP LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

991

ASH ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASH PHE ASH PRO GLN LEU GLN SER
 1001 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASH VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASH PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASH ASH LEU THR ILE PHE
 1171 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASH PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY GLY ASH ILE THR SER PRO
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASH GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASH GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1331 LEU LEU GLN GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASH LEU ARG GLY GLY VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASH SER PHE THR TYR
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASH SER VAL PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASH
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASH GLN ILE PRO LEU VAL CYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASH THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASH ILE ASH SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1111 PRO LEU GLN LYS THR PHE GLU ILE GLY GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE THR ASP PHE SER ASN PRO PHE SER PHE
 1361 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA VAL LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2161 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP THR MIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2251 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS MIS ALA LYS ARG LEU SER ASP GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

- 55 14. Recombinant expression and cloning vector containing at least part of the nucleotide sequence as defined in any one of Claims 1 to 13.

15. Plasmid according to Claim 14, characterized in that it is pHT671 as represented in Figure 4, or pHT71 comprising a HindIII - PstI DNA fragment consisting solely of DNA derived from the aizawai 7-29 strain, cloned into a vector pUC9 previously hydrolysed with the enzymes HindIII and PstI.
- 5 16. Modified bacterial strains, characterized in that after transformation, they contain a nucleotide sequence according to one of Claims 1 to 13.
17. Bacterial strain according to Claim 16, characterized in that it contains at least one recombinant vector according to Claim 14 or 15.
- 10 18. Polypeptide toxic against the larvae of Lepidoptera and preferentially against S. littoralis, characterized in that it is capable of forming an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis corresponding to the amino acid sequence (II) or (IV).
- 15 19. Polypeptide according to Claim 18, characterized in that it comprises the amino acid sequence (II) or (IV) defined in Claim 13.
- 20 20. Process for the production of a nucleotide sequence according to Claim 1 encoding at least part of the N-terminal region of a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, preferentially against S. littoralis, characterized by the following steps:
 - performing a hybridization between, on the one hand, a nucleotide sequence from a B. thuringiensis strain active against S. littoralis and, on the other hand, one or more nucleotide sequences, used as probes, derived, on the one hand, from the 5' part and, on the other hand, from the 3' part of a restriction fragment of a B. thuringiensis strain aizawai 7-29 δ -endotoxin gene, these 5' and 3' parts respectively encoding the NH₂-terminal part and the COOH-terminal part of a 130 kd polypeptide toxic against Lepidoptera, and in particular active against P. brassicae and inactive against S. littoralis, this gene having been cloned into the recombinant plasmid pHTA2, as represented in Figure 2,
 - isolating the fragment,
 - 30 - its cloning into a vector, followed by its purification.
21. Process according to Claim 20, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from at least one nucleotide sequence obtained from at least one recombinant vector containing a nucleotide sequence from at least one strain of B. thuringiensis.
- 35 22. Process according to Claim 21, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from several nucleotide sequences obtained from recombinant vectors containing nucleotide sequences from at least 2 different strains of B. thuringiensis, possessing the same restriction maps and containing themselves all or part of the nucleotide sequences capable of encoding a polypeptide active preferentially against S. littoralis.
- 40 23. Process according to Claim 21, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from a HindIII - PstI restriction fragment derived from the aizawai 7-29 strain.
- 45 24. Process according to Claim 22, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from a HindIII - HincII restriction fragment derived from the entomocidus 6-01 strain and from a HincII - PstI restriction fragment derived from the aizawai 7-29 strain.
- 50 25. Process according to Claim 20, characterized in that the recombined restriction fragment according to Claim 23 is carried by a plasmid pHTA6 as represented in Figure 1 and the recombined restriction fragments according to Claim 24, HindIII - HincII and HincII - PstI, are carried by the respective recombinant plasmids pHTE6 and pHTA6, the said plasmids pHTA6 and pHTE6 as represented in Figure 1 being as isolated with the aid of a probe consisting of a 2kb PvuII fragment of the plasmid pBT15-88 corresponding to the inner portion of a chromosomal crystal gene from the berliner 1715 strain, from transformant clones containing nucleotide sequences obtained from strains of B. thuringiensis active against larvae of Lepidoptera, inter alia of S. littoralis.
- 55

26. Larvicidal composition active preferentially against S. littoralis, characterized in that it contains an effective quantity of polypeptide as defined in one of Claims 18 and 19 expressed by the nucleotide sequences according to one of Claims 1 to 13, the vector according to Claim 14, or the plasmid according to Claim 15 or the bacterial strain according to either one of Claims 16 and 17.
27. Application of the nucleotide sequences according to any one of Claims 1 to 13 for producing a polypeptide toxic against Lepidoptera, preferably S. littoralis, in microorganisms capable of expressing recombinant vectors containing these sequences such as E. coli, B. subtilis, B. cereus or B. thuringiensis.
28. Application according to Claim 27, characterized in that the nucleotide sequences are introduced into microorganisms living in the environment or in association with plants, such as Pseudomonas, Azospirillum or Rhizobium and capable of expressing recombinant vectors containing these sequences.
29. Application according to Claim 27 or 28, characterized in that the nucleotide sequences are introduced into microorganisms in association with different δ -endotoxin genes.
30. Application of the nucleotide sequences according to any one of Claims 1 to 13 to the transformation of S. littoralis-sensitive plants, characterized in that it comprises the transfer and expression of these sequences in these plants.
31. Plant cells whose genome, after transformation by a non-essential biological process, stably possesses a nucleotide sequence capable of expressing a polypeptide toxic against S. littoralis, as defined in any one of Claims 1 to 13, and cells obtained from their division.
32. Plants having in particular as predator S. littoralis, which are transformed by a non-essentially biological process, whose genome stably possesses a nucleotide sequence as defined in any one of Claims 1 to 13, capable of expressing a polypeptide toxic against S. littoralis and, plants obtained from their reproduction, from their multiplication or from hybrid crossings.
33. Plant having in particular as predator S. littoralis, possessing in addition to their original genotypic and phenotypic characters the property of expressing a polypeptide corresponding to the amino acid sequence defined in Claim 13, toxic preferentially against S. littoralis, this property resulting from the insertion into its genome, by genetic engineering, of a nucleotide sequence capable of expressing the said polypeptide.
34. Seed capable of yielding a plant according to Claim 32 or 33 or obtained from such a plant, characterized in that it has, integrated into its genome, by genetic engineering, a nucleotide sequence according to any one of Claims 1 to 13.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die für mindestens einen Teil der N-terminalen Region eines Polypeptids kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter toxisch ist, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein DNA-Fragment von ca. 3 kb enthält, das dem Restriktionsfragment HindIII-PstI entspricht, welches aus B. thuringiensis, Stamm aizawai 7-29, stammt.
2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Restriktionsfragment HindIII-PstI dazu befähigt ist, mit den Sonden 1, 2 und 3 von pHTA2 zu hybridisieren, welche auf Fig. 2 dargestellt sind.
3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Stellen in der folgenden Reihenfolge enthält: HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.

4. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie für ein Polypeptid kodiert, das dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern
zu bilden, die gegen Polypeptide mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S.littoralis* gerichtet sind.
5. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie für ein von *S. littoralis* toxisches Polypeptid kodiert.
- 10 6. DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie
der Nachtfalter toxisch ist,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie ein DNA-Fragment enthält, das dem Restriktionsfragment HindIII - HincII von ca. 1,1 kb entspricht,
welches aus *B. thuringiensis*, Stamm entomocidus 601, stammt, welcher mit einem Restriktionsfrag-
ment HincII-PstI von ca. 1,9 kb fusioniert ist, das wiederum aus *B. thuringiensis*, Stamm aizawai 7-29,
15 stammt.
7. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
20 sie für ein Polypeptid kodiert, das dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern
zu bilden, die gegen Polypeptide mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S. littoralis* gerichtet sind.
8. Sequenz von Nukleotiden,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
25 sie die Befähigung besitzt, mit einer Sonde zu hybridisieren, die aus der Sequenz (I) gebildet ist,
welche die folgende Kette aufweist:

30

35

40

45

50

55

52
 GTC TAC TTG ACA GCG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GCG GCA TAT ATT GAT
 112
 ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
 172
 TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT ACT TTA ATA AAA AAA CCG
 232
 ACC TAT TTT ATG CAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TCG ATA CCT TAC AAT TGT TTA ACT AAT
 292
 CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
 352
 TCT CTC TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA CCG GCA GCA TTT TTA GTT
 412
 CGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GCA ATA GTT CCG CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA
 472
 CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT CAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT CCT
 532
 AAT TTA GAA GCA TTA GCA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG GAA
 592
 GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CCG TTT CGT ATA CTT GAT
 652
 GCG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
 712
 TCG GTT TAT GCT CAA CCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA ACA GAT TCT GTA ATT TTT
 772
 CGA GAA AGA TCG GCA TTC ACA ACC ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACC
 832
 CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT CCA AAT ACC TAT AAT CCG GCA TTA AAT AAT TTA
 892
 CCG AAA TCT ACC TAT CAA GAT TCG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTC
 952
 ACT GTA TTA GAT ATC CCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

35 oder welche Sonde aus der Sequenz (III) gebildet ist, die die folgende Kette aufweist:

40

45

50

55

1
 91
 101
 271
 361
 451
 541
 631
 721
 811
 901

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

1541
 1381
 2071
 2161
 2231
 2341
 2431
 2521
 2611
 2701
 161 1CC 16C AC

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

1541
 1381
 2071
 2161
 2231
 2341
 2431
 2521
 2611
 2701
 161 1CC 16C AC

9. Sequenz von Nukleotiden, die für ein Polypeptid kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter, vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*, toxisch ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie die in Anspruch 8 definierte Kette (I) oder (III) enthält.

10. Sequenz von Nukleotiden gemäß Anspruch 8 oder 9,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie ein Initiationskodon ATG in Position 241 aufweist.
- 5 11. Sequenz gemäß jedem der Ansprüche 8 bis 10,
gekennzeichnet durch
eine Bindungsstelle an Ribosomen GGAGG in Positionen 230 bis 234.
12. Sequenz gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11,
10 dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie die Sequenz von Nukleotiden von Position 137 bis 177 (Position -103 bis -63 von oberhalb des
Initiationskodons ATG) enthält, welche bezüglich ungefähr mindestens 70% der Region homolog ist,
die oberhalb des Kristallgens des Stammes kurstaki-HD1 Dipel (BTK) vorliegt und die drei Promotoren
Btl, BtlI und Ec enthält, die in B. thuringiensis bzw. E. coli funktionell sind.
- 15 13. Sequenz von Nukleotiden,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz (II) der folgenden Aminosäuren enthält:
- 20 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASI
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE
25 SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL
CLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA
30 ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP
35 GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE
40 GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU
45 PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP
- 50 oder dadurch **gekennzeichnet**, daß sie für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz (IV) der folgenden
Aminosäuren enthält:

55

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

PET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE

271 PRO ITH ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER ITH GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER

281 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL IAP GLY ILE VAL GLY PRO SER

431 GLN IAP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU

341 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU VAL TYR VAL GLU PHE LYS GLU IAP GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA ITH ARG TYR ARG VAL ILE

631 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR

721 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG IAP GLY LEU ITH ITH ILE ASN VAL ASN GLU

811 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN TYR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER

301 ITH ITH GLN ASP IAP ILE ITH TYR ASN ARG LEU ARG ASP LEU ITH TYR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

221

05M ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 1001 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 1171 THR ASP TAP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY MET HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 1201 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 1251 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL GLY PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR ILE
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL PHE SER THR THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG ITR ARG
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

114 MET PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR IAN ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 1901 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2101 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

55 14. Rekombinanter Expressions- und Klonierungsvektor, enthaltend mindestens einen Teil der in jedem der Ansprüche 1 bis 13 definierten Nukleotidsequenz.

15. Plasmid gemäß Anspruch 14,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
es sich um pHT671, wie dargestellt auf Figur 4, oder um pHT71 handelt, enthaltend ein DNA-Fragment
HindIII-PstI aus einziglich DNA, die aus dem Stamm aizawai 7-29 stammt, der in einem Vektor pUC9
5 kloniert ist, welcher vorab mit den Enzymen HindIII und PstI hydrolysiert ist.
16. Modifizierte Bakterienstämme,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie nach Transformation eine Sequenz von Nukleotiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13
10 enthalten.
17. Bakterienstamm gemäß Anspruch 16,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
er mindestens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 14 oder 15 enthält.
15
18. Polypeptid, das gegenüber Schmetterlingslarven und bevorzugt gegenüber *S. littoralis* toxisch ist,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
es dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern zu bilden, die gegen Polypeptide
der Sequenz (II) oder der Sequenz (IV) von Aminosäuren mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S.*
20 *littoralis* gerichtet sind.
19. Polypeptid gemäß Anspruch 18,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
es die Sequenz (II) oder die Sequenz (IV) der in Anspruch 13 definierten Aminosäuren enthält.
25
20. Verfahren zum Erhalt einer nukleotidischen Sequenz gemäß Anspruch 1, welche für mindestens einen
Teil der N-terminalen Region eines Polypeptids kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven
von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter, vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*, toxisch ist,
welches durch die folgenden Stufen gekennzeichnet ist:
30 - man führt eine Hybridisierung zwischen einerseits einer Sequenz von Nukleotiden eines gegen *S.*
littoralis aktiven Stammes von *B. thuringiensis* und andererseits einem oder mehreren Sequenzen
von Nukleotiden durch, welche als Sonden eingesetzt sind, welche aus dem Teil 5' einerseits und
dem Teil 3' andererseits eines Restriktionsfragments eines Gens eines δ -Endotoxins von *B.*
thuringiensis, Stamm aizawai 7-29, stammen, wobei diese Teile 5' und 3' jeweils für den N-
35 terminalen Teil und für den COOH-terminalen Teil eines Polypeptids von 130 kd kodieren, das
gegenüber Schmetterlingen toxisch und insbesondere gegen *P. brassicae* wirksam und gegen *S.*
littoralis unwirksam ist, wobei dieses Gen im in Fig. 2 dargestellten rekombinanten Plasmid
pHTA2 kloniert worden ist,
- man isoliert das Fragment und
40 - kloniert es in einen Vektor, worauf seine Reinigung erfolgt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
das in der Klonierungsstufe an den Vektor rekombinierte Fragment aus mindestens einer Sequenz von
45 Nukleotiden elaboriert ist, die aus mindestens einem rekombinanten Vektor hervorgegangen ist, der
eine Nukleotidsequenz mindestens eines Stammes von *B. thuringiensis* enthält.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
50 das in der Klonierungsstufe mit dem Vektor rekombinierte Fragment aus mehreren Nukleotidsequenzen
elaboriert ist, die aus rekombinanten Vektoren hervorgegangen sind, die Nukleotidsequenzen von
mindestens 2 von *B. thuringiensis* verschiedenen Stämmen enthalten, welche dieselben Restriktionskar-
ten besitzen und ihrerseits eine ganze oder einen Teil der Nukleotidsequenzen enthalten, die dazu
befähigt sind, für ein Polypeptid zu kodieren, das vorzugsweise gegenüber *S. littoralis* aktiv ist.
55
23. Verfahren gemäß Anspruch 21,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
das in der Klonierungsstufe mit dem Vektor rekombinierte Fragment aus einem Restriktionsfragment

HinIII-PstI elaboriert ist, welches aus dem Stamm aizawai 7-29 hervorgeht.

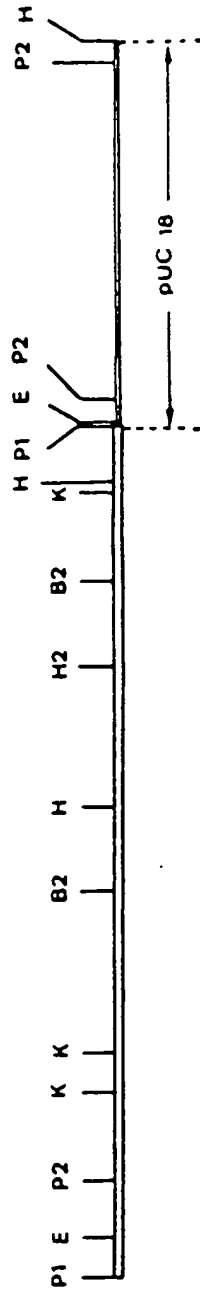
24. Verfahren gemäß Anspruch 22,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
5 das in der Klonierungsstufe an den Vektor rekombinierte Fragment aus einem Restriktionsfragment HindIII-HincII elaboriert ist, das aus dem Stamm entomocidus 601 und aus einem Restriktionsfragment HincII - PstI stammt, welches aus dem Stamm aizawai 7-29 hervorgeht.
25. Verfahren gemäß Anspruch 20,
10 dadurch **gekennzeichnet**, daß
das gemäß Anspruch 23 rekombinierte Restriktionsfragment von einem in Fig. 1 dargestellten Plasmid pHTA6 und die gemäß Anspruch 24 rekombinierten Restriktionsfragmente HindIII-HincII und HincII-PstI von den rekombinanten Plasmiden pHTe6 bzw. pHTA6 gehalten sind, wobei die in Fig. 1 dargestellten
15 genannten Plasmide pHTA6 und pHTe6 so vorliegen, wie sie mittels einer Sonde aus einem Fragment PvuII von 2 kb des Plasmids pBT15-88 isoliert sind, das dem inneren Teil eines chromosomischen Kristallgens des Stammes berliner 1715 entspricht, ausgehend von transformanten Klonen, die nukleotidische Sequenzen einschließen, welche aus Stämmen *B. thuringiensis* hervorgegangen sind, die gegenüber Larven von Schmetterlingen u.a. von *S. littoralis* wirksam sind.
- 20 26. Larvizide Zusammensetzung mit einer Wirksamkeit vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie eine wirksame Menge von in jedem der Ansprüche 18 und 19 definierten Polypeptid enthält, das durch die nukleotidischen Sequenzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, durch den Vektor gemäß
25 Anspruch 14 oder das Plasmid gemäß Anspruch 15 oder den bakteriellen Stamm gemäß jedem der Ansprüche 16 oder 17 exprimiert ist.
27. Anwendung der Sequenzen von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 zur
Erzeugung eines Polypeptids, das gegenüber Schmetterlingen, vorzugsweise *S. littoralis*, toxisch ist, in
30 Mikroorganismen, die dazu befähigt sind, rekombinante Vektoren zu exprimieren, welche diejenigen Sequenzen wie *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* oder *B. thuringiensis* aufweisen.
28. Anwendung gemäß Anspruch 27,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
35 die Sequenzen von Nukleotiden in Mikroorganismen eingebracht sind, die im Umfeld oder zusammen mit Pflanzen, wie *Pseudomonas*, *Azospirillum* oder *Rhizobium*, leben und dazu befähigt sind, diese Sequenzen aufweisende rekombinante Vektoren zu exprimieren.
29. Anwendung gemäß Anspruch 27 oder 28,
dadurch **gekennzeichnet**, daß
40 die Sequenzen von Nukleotiden in Mikroorganismen zusammen mit verschiedenen Genen von δ -Endotoxin eingebracht sind.
30. Anwendung von Sequenzen von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 zur
Transformation von gegenüber *S. littoralis* empfindlichen Pflanzen,
45 dadurch **gekennzeichnet**, daß
sie den Transfer und die Expression dieser Sequenzen in diesen Pflanzen umfaßt.
31. Pflanzliche Zellen, deren Genom, nach Transformation durch ein nicht-wesentlich biologisches Verfahren, in stabiler Form eine Sequenz von Nukleotiden besitzt, die dazu befähigt ist, ein gegenüber *S.*
50 *littoralis* toxisches, in jedem der Ansprüche 1 bis 13 definiertes Polypeptid zu exprimieren, sowie aus deren Teilung hervorgegangene Zellen.
32. Pflanzen, die *S. littoralis* insbesondere zum Räuber haben, welche durch ein nicht-wesentlich biologisches Verfahren transformiert sind, deren Genom in stabiler Form eine in einem jeden der Ansprüche 1
55 bis 13 definierte Sequenz von Nukleotiden besitzt, welche dazu befähigt ist, ein gegenüber *S. littoralis* toxisches Polypeptid zu exprimieren, sowie Pflanzen, die aus deren Reproduktion, Vervielfältigung oder Kreuzungshybriden hervorgegangen sind.

33. Pflanze, die *S. littoralis* insbesondere zum Räuber hat, welche zusätzlich zu ihren genotypischen und phänotypischen Anfangsmerkmalen die Eigenschaft besitzt, ein bevorzugt gegenüber *S. littoralis* toxisches Polypeptid gemäß der in Anspruch 13 definierten Sequenz von Aminosäuren zu exprimieren, wobei diese Eigenschaft aus der in ihr Genom durch genetische Manipulation vorgenommenen Insertion einer zur Expressierung des genannten Polypeptids befähigten Sequenz von Nukleotiden resultiert.

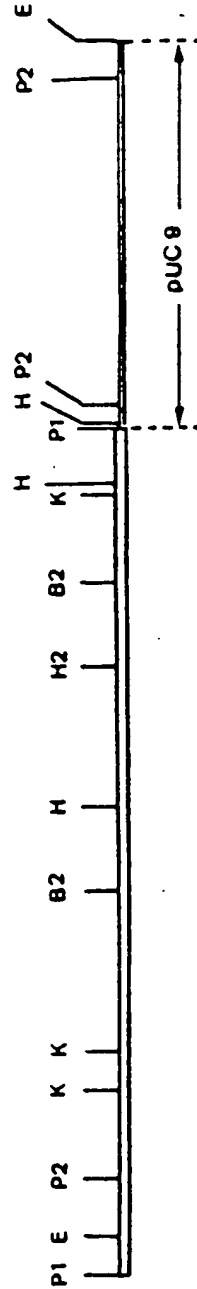
34. Korn, das dazu befähigt ist, eine Pflanze gemäß Anspruch 32 oder 33 zu ergeben, oder welches aus einer solchen Pflanze hervorgegangen ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß es in seinem Genom durch genetische Manipulation eine Sequenz von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 integriert enthält.

FIGURE 1

pHTA 6



pHTE 6



B2 : Bgl II
 E : Eco RI
 H2 : Hinc II
 H : Hind III
 K : Kpn I
 P1 : Pst I
 P2 : Pvu II

1Kb

FIGURE 2

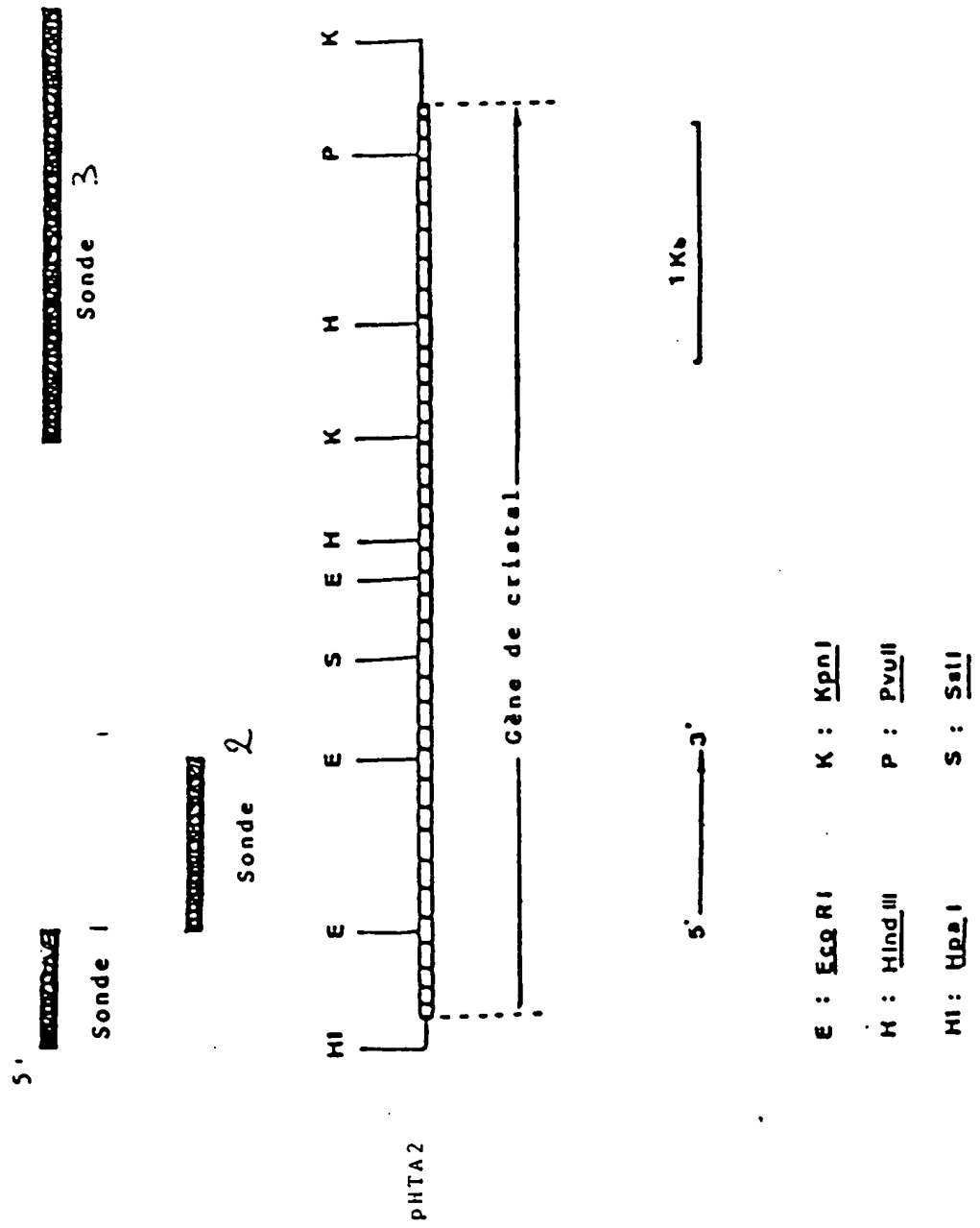


FIGURE 3



H: Hind III

P: Pst I

K: Kpn I

H2: Hinc II

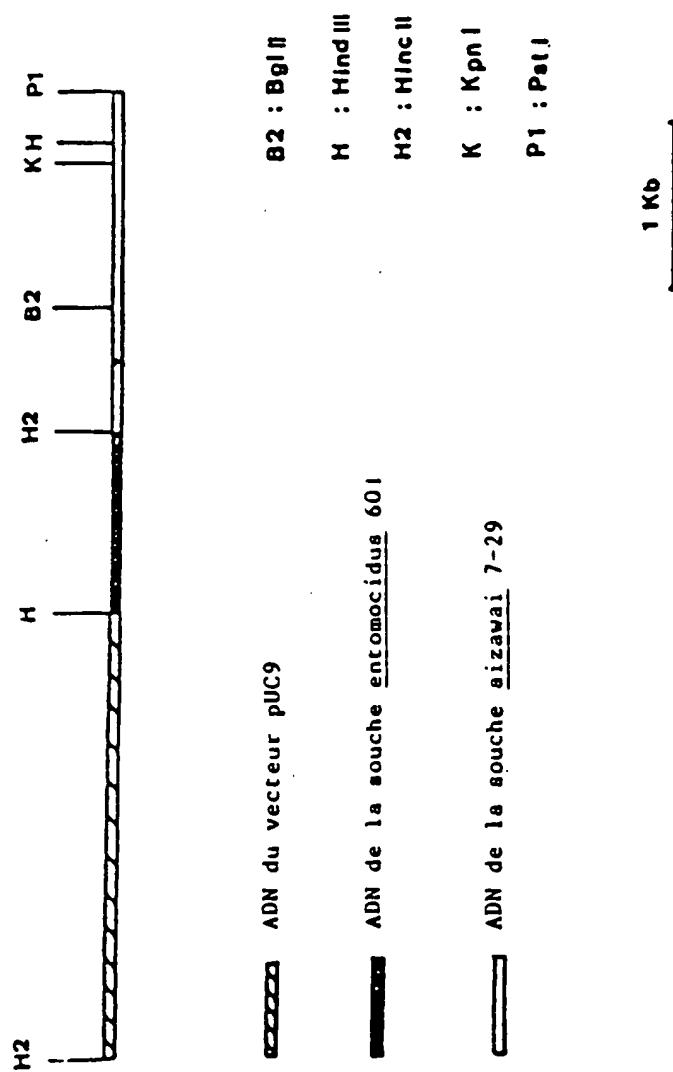
Sonde 3

Sonde 2

Sonde 1

FIGURE 4

PHT 671



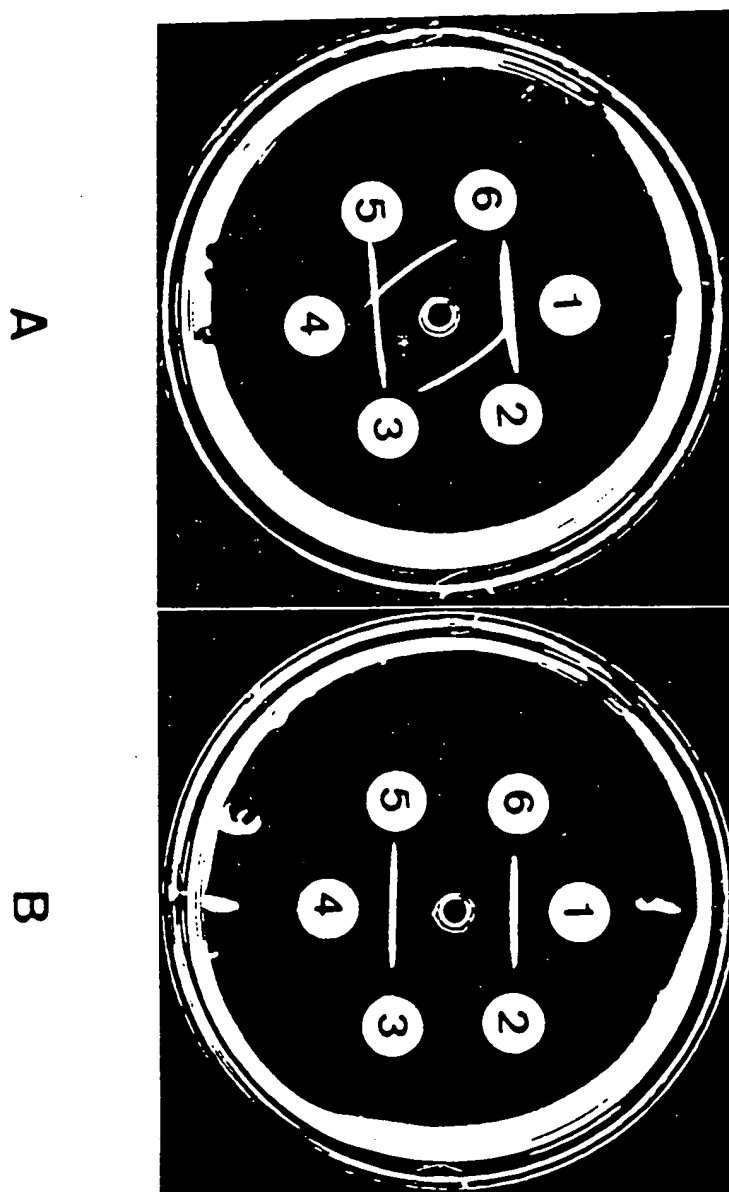


FIGURE 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLATED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER :** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning these documents *will not* correct the image
problems checked, please do not report these problems to the
IFW Image Problem Mailbox.**